

De bijdrage van muismodellen bij studies naar multipel myeloom

Auteurs K. Vanderkerken, E. Van Valckenborgh, E. Menu, H. De Raeve, I. Van Riet, R. Schots, J. Caers en B. Van Camp

Trefwoorden muismodellen, multipel myeloom

Samenvatting

Multipel myeloom is een ongeneeslijke, maligne aandoening, waarvoor nieuwe therapieën dienen te worden ontwikkeld. Myeloomcellen groeien voornamelijk in het beenmerg, als gevolg van een complexe interactie met verschillende cellen en eiwitten van het beenmergstroma. In-vitro-experimenten richten zich meestal op 1 aspect van deze interacties, terwijl diermodellen

toelaten om ze in hun complexiteit te bestuderen. In de laatste decennia zijn verschillende muismodellen ontwikkeld en gebruikt. Het is belangrijk erop te wijzen dat elk model zijn voor- en tegens heeft en dat onderzoekers het juiste model dienen te kiezen voor hun vraagstelling.

(*Ned Tijdschr Hematol* 2007;4:139-43)

Inleiding

Multipel myeloom (MM) is de tweede meest voorkomende hematologische maligniteit en wordt gekarakteriseerd door een accumulatie van plasmacellen in het beenmerg (BM) die een monoklonaal immunoglobuline (paraproteïne of M-component) secreteren. Klinische manifestaties zijn onder andere osteolytische botlaesies, anemie, nierfalen, immuundeficiëntie met recidiverende infecties, en hypercalciëmie. Nieuwe ontwikkelingen in de medicamenteuze therapie en stamceltransplantaties hebben de prognose van de MM-patiënten gedurende de laatste jaren beduidend verbeterd. Toch blijft het een ongeneeslijke ziekte, waarvan de behandeling een permanente uitdaging is.

Nieuwe behandelingen hebben niet alleen de MM-cel als doelwit, maar ook de MM-gastheerinteracties. Het gedrag van de MM-cellen wordt immers niet alleen beïnvloed door de genetische achtergrond van de tumorcellen, maar ook door de BM-microomgeving. Deze laatste bestaat uit een heterogene populatie die enerzijds bestaat uit hematopoëtische stamcellen, precursorcellen, immuuncellen, erythrocyten, fibroblasten, adipocyten, endotheelcellen, osteoblasten en osteoclasten, en anderzijds uit extracellulaire matrixeiwitten en groeifactoren. De lijst

met groeifactoren neemt voortdurend toe en bevat onder andere IL-6, IGF-1, VEGF, IL-1 β , SDF-1 α , TNF- α , 'B cell activating factor belonging to the TNF family' (BAFF), 'a proliferation inducing ligand' (APRIL), MIP-1 α , osteopontine, Wnt en leden van de Notchfamilie.

De studie naar de fundamentele rol van deze complexe interacties en van de mogelijkheid tot therapeutische interventie vereist meer dan alleen syngene coculturen; in-vivomodellen die de humane ziekte het meest benaderen zijn noodzakelijk om het complexe samenspel tussen deze verschillende celtypes te analyseren. Hiervoor zijn onder andere verschillende muismodellen ontwikkeld. In dit artikel wordt een overzicht gegeven van de meest gebruikte myeloommuismodellen.

In-vivomuismodellen

De laatste jaren werden verschillende in-vivomuismodellen ontwikkeld, elk met zijn voor- en nadelen. Een geschikt model moet de klassieke karakteristieken van een myeloom ontwikkelen (waaronder groei in het BM, correlatie met serumparaproteïneconcentratie, inductie van angiogenese) en dient geschikt te zijn om naast het beantwoorden van

fundamenteel biologische vragen, ook het therapeutisch potentieel van een bepaalde behandeling te testen.

Plasmacytoma in Balb/c-muizen

Intraperitoneale injectie van minerale oliën, zoals pristaan, in Balb/c-muizen induceert proliferatie en accumulatie van plasmacellen in het peritoneum. Deze cellen kunnen worden getransplanteerd naar het peritoneum van syngene recipiëntmuizen, die vooraf werden behandeld met pristaan.¹ Het ziektebeeld van een plasmacytoma verschilt echter van dat van een myeloom, wat het gebruik van deze modellen voor de studie van MM sterk beperkt.

Syngene modellen

Er zijn verschillende modellen ontwikkeld waarbij muizencellijnen worden ingespoten. Voorbeelden zijn de B38- en C11C1-cellijnen, afgeleid van de P3X63Ag8-celijn. Deze cellen worden subcutaan ingespoten in Balb/c-muizen, waarna de grootte van de tumor en de bloedvatdensiteit kunnen worden bepaald.² Een ander voorbeeld zijn SP2/0-cellen die subcutaan worden ingespoten. Het tumorgewicht wordt hierbij als voornaamste parameter voor de tumorload gebruikt.³ De voordelen van deze modellen zijn dat ze gemakkelijk te onderhouden en immuuncompetent zijn. De nadelen van deze modellen zijn dat de tumorcellen niet afhankelijk zijn van een BM-micro-omgeving en dat de invloed van deze micro-omgeving op de groei van de MM-cellen niet kan worden nagegaan.

5TMM-modellen

80% van de oudere C57Bl/KaLwRij-muizen ontwikkelt spontaan 'monoclonal gammopathy of undetermined significance' (MGUS), met analoge karakteristieken als de humane aandoening. In 0,5% van de muizen ouder dan 2 jaar ontwikkelt zich ook spontaan een MM. Radl et al. ontwikkelden uit deze muizen verschillende 5TMM-modellen: ziek BM werd geïsoleerd en intraveneus ingespoten in syngene naïeve dieren.⁴ Op deze manier ontstonden verschillende 5TMM-modellen, elk met een verschillende groeikarakteristiek en daardoor ook model voor verschillende types myeloom. De verschillende modellen groeien in het BM, de tumorload is gecorreleerd met de serumparaproteïneconcentratie (M-component in de γ -regio) en is geassocieerd met een verminderde normale hematopoëse. De 5T2- en 5T33MM-modellen werden het beste gekarakteriseerd. 5T2MM is model voor

het meest voorkomende myeloom, met een matige groei en de ontwikkeling van osteolytische laesies. Het 5T33MM-model heeft een agressievere groei en ontwikkelt weinig opvallende botlaesies. De biologische overeenkomsten tussen het menselijke model en 5T-myeloommuismodel zijn verrassend gelijklopend.^{5,7} Beide modellen groeien in het BM en induceren angiogenese. Ze zijn gebruikt om zowel biologische vragen op te lossen, als om het therapeutisch potentieel van een bepaalde behandeling te testen in preklinische experimenten.⁵⁻⁷

In Brussel zijn deze modellen gebruikt om onder ander de homing van de MM-cellen naar de BM-micro-omgeving te bestuderen.⁶ Preklinische tests met bijvoorbeeld osteoprotegerine, het krachtige bifosfonaat zoledronaat, een breedspectrum matrix-metalloproteïnase-inhibitor, en de specifieke IGF-1 R-inhibitor picropodophyllin tonen aan dat de verschillende aspecten van MM-ontwikkeling (tumorload, serumparaproteïneconcentratie, inductie van angiogenese, ontwikkeling van botlaesies) kunnen worden gevolgd.⁸⁻¹²

Van het 5T2MM-model werd een agressievere variant ontwikkeld, 5THL, waarbij na ovariëctomie de 5T2MM ingespoten werd in C57Bl/KaLwRij-muizen.¹³ Anderen transduceerden 5T33MM-cellen met eGFP, wat de detectie van de tumorcellen met flowcytometrie mogelijk maakte.¹⁴

SCID-modellen

'Severe combined immunodeficient' (SCID)-muizen worden gebruikt om verschillende tumoren in vivo te bestuderen. De SCID-muizen ontstonden initieel door een puntmutatie in chromosoom 16 van de CB-17-inbred-muizenstam, wat leidde tot een verstoring van de lymfocytmaturing en een deficiëntie van B- en T-cellen. De SCID-muizen hebben wel een normale ontwikkeling van monocytten, natural-killercellen en granulocyten, waardoor deze muizen een immuunrespons ontwikkelen tegen de humane xenograft.¹⁵ De SCID-mutatie werd verder teruggekruist met de 'non-obese diabetic' (NOD)-stam, waardoor bijkomende immunologische deficiënties ontstonden. Er werden varianten ontwikkeld van deze NOD/SCID-muizen, waaronder de NOD/SCID/ γ^{null} (NOG)-muizen.¹⁶ De NOG-muizen hebben geen B- en T-lymfocyten en hebben tevens een verstoorde functie van dendritische cellen. Veel van deze muizen worden bestraald. Het is belangrijk om het effect van bestraling op de BM-micro-omgeving te beschouwen wanneer men

dergelijke modellen gebruikt: bestraling beïnvloedt zowel de stromale BM-cellen als de endotheelcellen door inductie van apoptose, veranderde adhesiemoleculuexpressie, verhoogde cytokineproductie en veranderde botstructuur.^{17,18} Bovendien worden in een aantal studies de MM-lijnen, zoals bijvoorbeeld ARH-77, gebruikt die EBV-positief zijn en niet als 'echte' MM-cellijnen worden erkend.¹⁹

SCID-xenograftmodellen

Humane MM-cellijnen kunnen groeien in SCID-muizen. De tumorale cellen migreren naar het BM van de muis en groeien daar binnen de BM-micro-omgeving. Infiltratie in andere organen zoals lymfklieren, longen, lever, milt en hersenen wordt echter eveneens gezien. Wanneer primaire MM-cellen worden ingespoten in SCID-muizen, is de kans op tumorontwikkeling echter vrij klein.

De onderzoeksgroep van Pilarski et al. slaagde erin om MM-cellen te isoleren uit het bloed van MM-patiënten (na mobilisatie van de cellen met 'granulocyt colony stimulating factor', intracardiaal of intraosseus) en te injecteren in NOD/SCID-muizen.²⁰ Dit leidde tot MM-groei op verschillende BM-locaties, de ontwikkeling van osteolytische botlaesies en de aanwezigheid van humaan paraproteïne in het serum van de muizen. Deze verschillende SCID-modellen werden gebruikt om nieuwe technieken te testen.

Recentelijk werd het LAGlambda-1-model beschreven.²¹ Hierbij werden humane MM-patiëntensamples ingespoten in het bot van SCID-muizen. In de meeste van deze muizen werden tumoren gevormd. Deze werden geïsoleerd en na intramusculaire passage kon een groot aantal muizen worden ingespoten.

SCID-hu-model

Een van de belangrijke beperkingen van het SCID-model is de afwezigheid van een humane BM-micro-omgeving voor het onderzoek naar de groei van de humane MM-cellen. Epstein et al. ontwikkelden het SCID-hu-model. Hierbij worden humane foetale botten geplaatst in een SCID-muis, gevolgd door bestraling en implantatie van de verse humane cellen in het foetale bot. Dit resulteerde in de ontwikkeling van een MM dat geassocieerd was met tumorgroei in het foetale bot, de ontwikkeling van botlaesies en angiogenese. In het serum van de zieke muizen was monokonaal humaan immunoglobuline detecteerbaar.²² De nadelen van deze modellen zijn enerzijds het beperkte aantal humane MM-cellen dat kan worden gebruikt om verschillende dieren in te

spuiten en anderzijds de ethische kwesties betreffende het gebruik van humaan foetaal materiaal.

Anderson et al. ontwikkelden een variant waarbij 'green fluorescent protein' (GFP)-positieve humane INA-6-cellen, die IL-6 afhankelijk zijn, getransplanteerd werden in SCID-hu-muizen. Dit leidde tot een MM dat kan worden opgevolgd met fluorescentie-imaging van de muizen.²³

SCID-rab-model

De onderzoeksgroep van Yaccoby ontwikkelde het SCID-rab-model, waarbij konijnenbotten subcutaan werden geïmplanteerd in SCID-muizen.²⁴ Verse humane MM-cellen werden ingespoten in de botten en genereerden een typische MM met ontwikkeling van botlaesies en inductie van angiogenese.

Transgene modellen

Dubbel transgene Myc/Bcl-X(L)-muizen ontwikkelen plasmaceltumoren. Deze tumoren produceren monokonaal immunoglobuline, infiltreren het BM en hebben een verhoogde expressie van Myc(His) en Bcl-X(L)(Flag)-proteïnen vergeleken met plasmacellen in jonge, tumorvrije Myc/Bcl-X(L)-muizen. Deze verhoogde expressie genereert dus een genetisch geïnduceerd muismodel dat sommige eigenschappen heeft die gelijkwaardig zijn aan het humaan MM.²⁵

Conclusie

Dit artikel geeft een kort overzicht van de meest gebruikte muismodellen voor MM. De lezer wordt er op gewezen dat vooraleer een experimenteel model voor een bepaalde studie wordt gekozen, duidelijk de mogelijkheden en beperkingen van ieder model dienen te worden beschouwd. De meeste in-vivomodellen, en in het bijzonder deze waar de MM-cellen in een BM-micro-omgeving groeien, bieden het grote voordeel dat de complexe interacties tussen tumor en micro-omgeving kunnen worden bestudeerd (homing, inductie van angiogenese en osteolyse, immuuncontrole). De syngene en transgene muismodellen hebben het voordeel van een syngene, immuuncompetente omgeving die niet is bestraald, maar de hiermee verkregen resultaten dienen te worden bevestigd met humane cellen. De SCID-modellen bieden humane MM-cellijnen een muis-BM-micro-omgeving, terwijl de verschillende SCID-hu-modellen een humane BM-micro-omgeving bieden. Deze missen echter een immuunsysteem en een volwassen, niet-bestraald, stroma.

Aanwijzingen voor de praktijk

1. Multipel myeloom is nog steeds een ongeneeslijke hematologische maligniteit, waarbij de overleving en groei van de tumorcellen vooral afhangt van de beenmergmicro-omgeving.
2. Het onderzoeken van de groei van de myeloomcellen vereist vaak een in-vivomodel waarbij de tumorcellen in het beenmerg groeien.
3. Experimentele muismodellen hebben elk hun mogelijkheden en beperkingen. Onderzoekers dienen het juiste model te kiezen voor hun vraagstelling.

De laatste decennia zijn verschillende muismodellen ontwikkeld voor MM, ieder met eigen karakteristieken en eigen mogelijkheden en beperkingen. Deze verschillende modellen hebben een grote bijdrage geleverd aan het verkrijgen van een beter inzicht in de MM-biologie en in de ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën.

Referenties

1. Potter M, Wax JS. Peritoneal plasmacytomagenesis in mice: comparison of different pristane dose regimens. *J Natl Cancer Inst* 1983;71:391-5.
2. Sainz IM, Isordia-Salas I, Espinola RG, Long WK, Pixley RA, Colman RW. Multiple myeloma in a murine syngeneic model: modulation of growth and angiogenesis by a monoclonal antibody to kininogen. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55:797-807.
3. Dou J, Hong X, Zhao F, Wang J, Chen J, Chen G. Investigation of GM-CSF immune accessory effects in tumor-bearing mice by direct gene immunization. *Immunol Invest* 2006;35:227-37.
4. Radl J, De Groot ED, Schuit HR, Zurcher C. Idiopathic paraproteinemia. II. Transplantation of the paraprotein-producing clone from old to young C57BL/KaLwRij mice. *J Immunol* 1979;122:609-13.
5. Caers J, Asosingh K, Van Riet I, Van Camp B, Vanderkerken K. Of mice and men: disease models of multiple myeloma. *Drug discovery today: disease models* 2004;1:373-80.
6. Menu E, Asosingh K, Van Riet I, Croucher P, Van Camp B, Vanderkerken K. Myeloma cells (5TMM) and their interactions with the marrow microenvironment. *Blood Cells Mol Dis* 2004;33:111-9.
7. Vanderkerken K, Asosingh K, Croucher P, Van Camp B. Multiple myeloma biology: lessons from the 5TMM models. *Immunol Rev* 2003;194:196-206.
8. Croucher PJ, Shipman CM, Lippitt J, Perry M, Asosingh K, Hijzen A, et al. Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood* 2001;98:3534-40.
9. Vanderkerken K, De Leenheer E, Shipman C, Asosingh K, Willems A, Van Camp B, et al. Recombinant osteoprotegerin decreases tumor burden and increases survival in a murine model of multiple myeloma. *Cancer Res* 2003;63:287-9.
10. Croucher PJ, De Hendrik R, Perry MJ, Hijzen A, Shipman CM, Lippitt J, et al. Zoledronic acid treatment of 5T2MM-bearing mice inhibits the development of myeloma bone disease: evidence for decreased osteolysis, tumor burden and angiogenesis, and increased survival. *J Bone Miner Res* 2003;18:482-92.
11. Van Valckenborgh E, Croucher PJ, De Raeye H, Carron C, De Leenheer E, Blacher S, et al. Multifunctional role of matrix metalloproteinases in multiple myeloma: a study in the 5T2MM mouse model. *Am J Pathol* 2004;165:869-78.
12. Menu E, Jernberg-Wiklund H, Stromberg T, De Raeye H, Girnita L, Larsson O, et al. Inhibiting the IGF-1 receptor tyrosine kinase with the cyclolignan PPP: an in vitro and in vivo study in the 5T33MM mouse model. *Blood* 2006;107:655-60.
13. Libouban H, Moreau MF, Basle MF, Bataille R, Chappard D. Selection of a highly aggressive myeloma cell line by an altered bone microenvironment in the C57BL/KaLwRij mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;316:859-66.
14. Alici E, Konstantinidis KV, Aints A, Dilber MS, Abedi-Valugerdi M. Visualization of 5T33 myeloma cells in the C57BL/KaLwRij mouse: establishment of a new syngeneic murine model of multiple myeloma. *Exp Hematol* 2004;32:1064-72.
15. Bankert RB, Egilmez NK, Hess SD. Human-SCID mouse chimeric models for the evaluation of anti-cancer therapies. *Trends Immunol* 2001;22:386-93.
16. Miyakawa Y, Ohnishi Y, Tomisawa M, Monnai M, Kohmura K, Ueyama Y, et al. Establishment of a new model of human multiple myeloma using NOD/SCID/gammac(null) (NOG) mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313:258-62.
17. Gaugler MH, Squiban C, Claraz M, Schweitzer K,

Weksler B, Gourmelon P, et al. A Characterization of the response of human bone marrow endothelial cells to in vitro irradiation. *Br J Haematol* 1998;103:980-9.

18. Hopewell JW. Radiation-therapy effects on bone density. *Med Pediatr Oncol* 2003;41:208-11.

19. Pellat-Deceunynck C, Amiot M, Bataille R, Van Riet I, Van Camp B, Omede P, et al. Human myeloma cell lines as a tool for studying the biology of multiple myeloma: a reappraisal 18 years after. *Blood* 1995;86:4001-2.

20. Pilarski LM, Hipperson G, Seeberger K, Pruski E, Coupland RW, Belch AR. Myeloma progenitors in the blood of patients with aggressive or minimal disease: engraftment and self-renewal of primary human myeloma in the bone marrow of NOD SCID mice. *Blood* 2000;95:1056-65.

21. Campbell RA, Manyak SJ, Yang HH, Sjak-Shie NN, Chen H, Gui D, et al. LAGlambda-1: a clinically relevant drug resistant human multiple myeloma tumor murine model that enables

rapid evaluation of treatments for multiple myeloma. *Int J Oncol* 2006;28:1409-17.

22. Yaccoby S, Barlogie B, Epstein J. Primary myeloma cells growing in SCID-hu mice: a model for studying the biology and treatment of myeloma and its manifestations. *Blood* 1998;92:2908-13.

23. Tassone P, Neri P, Burger R, Savino R, Shamma M, Catley L, et al. Combination therapy with interleukin-6 receptor superantagonist Sant7 and dexamethasone induces antitumor effects in a novel SCID-hu in vivo model of human multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2005;11:4251-8.

24. Yata K, Yaccoby S. The SCID-rab model: a novel in vivo system for primary human myeloma demonstrating growth of CD138-expressing malignant cells. *Leukemia* 2004;18:1891-7.

25. Cheung WC, Kim JS, Linden M, Peng L, Van Ness B, Polakiewicz RD, et al. Novel targeted deregulation of c-Myc cooperates with Bcl-X(L) to cause plasma cell neoplasms in mice. *J Clin Invest* 2004;113:1763-73.

Ontvangen 22 augustus 2006, geaccepteerd 3 oktober 2006.

Correspondentieadres

Mw. prof. dr. K. Vanderkerken, bioloog
Mw. dr. E. Van Valckenborgh, licentiaat Biomedische Wetenschappen
Mw. dr. E. Menu, licentiaat Biomedische Wetenschappen
Prof. dr. I. Van Riet, bioloog
Prof. dr. R. Schots, internist-hematoloog
Dr. J. Caers, internist-hematoloog
Prof. dr. B. Van Camp, internist-hematoloog

Vrije Universiteit Brussel
Afdeling Hematologie en Immunologie
Laarbeeklaan 103
B-1090 Brussel
België
Tel.: 00 32 2 477 44 18
E-mailadres: karin.vanderkerken@vub.ac.be

Dr. H. De Raeve, patholoog

Universitair Ziekenhuis Antwerpen
Dienst Pathologie
Wilrijkstraat 10
B-2650 Edegem
België

Correspondentie graag richten aan de eerste auteur.

Belangenconflict: geen gemeld.
Financiële ondersteuning: geen gemeld.